

**THERAPEUTIC AGENT FOR MITE ALLERGY****Patent number:** JP6192085**Publication date:** 1994-07-12**Inventor:** INADA YUJI; others: 02**Applicant:** YUJI INADA; others: 01**Classification:****- International:** A61K31/22; A61K31/19; A61K31/40; A61K31/415;  
A61K37/64**- european:****Application number:** JP19930234199 19930826**Priority number(s):****Abstract of JP6192085**

**PURPOSE:** To obtain a therapeutic agent, having inhibitory activity against a mite protease and useful for treating and preventing mite allergic diseases (e.g. asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis).

**CONSTITUTION:** This therapeutic agent for mite allergy comprises one or more substances selected from aprotinin, potato protease inhibitors, soybean trypsin inhibitors, antipain, leupeptin, guanidino-fatty acid derivatives, guanidinobenzoic acid derivatives and amidinophenolic derivatives as an active ingredient.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-192085

(43)公開日 平成6年(1994)7月12日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 61 K 31/22		9283-4C		
31/19	A B F	9283-4C		
31/40		7431-4C		
31/415		7431-4C		
37/64		8314-4C		

審査請求 未請求 請求項の数 4(全 12 頁)

(21)出願番号	特願平5-234199	(71)出願人	591073946 稻田 祐二 東京都大田区下丸子2丁目24番10号 多摩 川ハイム1号棟808号
(22)出願日	平成5年(1993)8月26日	(71)出願人	000185983 小野薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号
(31)優先権主張番号	特願平4-253437	(72)発明者	稻田 祐二 東京都大田区下丸子2丁目24-10-1- 808
(32)優先日	平4(1992)8月31日	(72)発明者	二見 瑞子 埼玉県浦和市辻2丁目20番地31号
(33)優先権主張国	日本 (JP)	(74)代理人	弁理士 大家 邦久

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ダニアレルギー治療剤

(57)【要約】

【構成】アプロチニン、ポテトプロテアーゼインヒビター、大豆トリプシンインヒビター、アンチパイン、ロイペプチジン、グアニジノ脂肪酸誘導体、グアニジノ安息香酸誘導体、およびアミジノフェノール誘導体から選ばれる1種またはそれ以上の物質を有効成分として含有するダニアレルギー治療剤。

【効果】本発明に用いられる各物質はダニプロテアーゼに対する阻害活性を有しているので、ダニアレルギー疾患(例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎等)の治療や予防に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アプロチニン、ボテトプロテアーゼインヒビター、大豆トリプシンインヒビター、アンチペイント、ロイペプチノ、グアニジノ脂肪酸誘導体、グアニジノ安息香酸誘導体、およびアミジノフェノール誘導体から選ばれる 1 種またはそれ以上の物質を有効成分として含有するダニアレルギー治療剤。

【請求項 2】 有効成分が 6-グアニジノヘキサン酸・p-エトキシカルボニルフェニルエステルまたはその酸付加塩である請求項第 1 項記載の治療剤。

【請求項 3】 有効成分が、p-(p-グアニジノベンゾイルオキシ) フェニル酢酸・N、N-ジメチルカルバモイルメチルエステル、p-グアニジノ安息香酸・1-(N, N-ジメチルカルバモイルメトキシカルボニル)-2-ナフチルエステル、p-グアニジノ安息香酸・p-(N-フェニル-N-エトキシカルボニルメチルカルバモイルメチル) フェニルエステル、p-グアニジノ安息香酸・p-[ (2-エトキシカルボニル-1-インドリニル) カルボニルメチル] フェニルエステル、p-グアニジノ安息香酸・p-[ (3-エトキシカルボニル-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-2-イル) カルボニル] フェニルエステル、p-グアニジノ安息香酸・p-[ (2-エトキシカルボニル-1-インドリニル) カルボニル] フェニルエステル、p-グアニジノ安息香酸・p-[ (N-ペンジル-N-エトキシカルボニルメチル) スルファモイル] フェニルエステル、p-グアニジノ安息香酸・3-クロロ-5-ヒドロキシフェニルエステル、p-グアニジノ安息香酸・3-クロロ-4-ピバロイルオキシフェニルエステル、p-グアニジノ安息香酸・p-スルファモイルフェニルエステル、p-(p-グアニジノベンゾイルオキシ) フェニル酢酸・p-グアニジノ安息香酸・6-アミジノナフト-2-イルエステル、およびそれらの酸付加塩から選ばれる 1 種またはそれ以上の物質である請求項第 1 項記載の治療剤。

【請求項 4】 有効成分が、5-[p-(p-アミジノフェノキシカルボニル) ベンジリデン]-3-エトキシカルボニルメチルロダン、1-[p-(p-アミジノフェノキシカルボニル) ベンジル]-2-イソプロピルイミダゾール、p-(p-アミジノフェノキシカルボニル) 安息香酸・N-[1-エトキシカルボニル-2-(3-インドリル) エチル] アミド、p-(p-アミジノフェノキシカルボニル) 安息香酸・2S-エトキシカルボニル-1-ピロリジニルアミド、p-(p-アミジノフェノキシカルボニル) 安息香酸・2R-ベンジルオキシカルボニル-1-ピロリジニルアミド、4-[ (4-アミジノ-2-メトキシカルボニル) フェノキシカルボニル] 安息香酸・N-フェニル-N-エトキシカルボニルメチルアミド、p-(p-アミジノフェノキシカルボニル)- $\alpha$ -メチル桂皮酸・N-[1R-エトキシカ

ルボニル-2-(3-インドリル) エチル] アミドおよびそれらの酸付加塩から選ばれる 1 種またはそれ以上の物質である請求項第 1 項記載の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ある種の蛋白分解酵素阻害剤を有効成分として含有するダニアレルギー治療剤に関する。

【0002】

【発明の背景】 呼吸によってヒトに吸い込まれたイエダニは、外因性の喘息、アレルギー性鼻炎やアトピー性皮膚炎を引き起こすことが知られている [J. Allergy, 39, 325 (1967) および同誌, 42, 14 (1968) 参照のこと]。最近、イエダニの一一種であるデルマトファゴイデス・ファリナエ (*Dermatophagoides farinae*) とデルマトファゴイデス・ブテロナイシナス (*Dermatophagoides pteronyssinus*) からそれぞれ分子量 25,000 と 15,000 の主要なアレルゲン蛋白が単離された [J. Immunol., 125, 587 (1980) および Int. Archs Allergy Appl. Immunol., 81, 214 (1986)]。また別の報告では、デルマトファゴイデス・ブテロナイシナス (*Dermatophagoides pteronyssinus*) から 2 種類のプロテアーゼ（蛋白分解酵素）が単離され、それらの酵素が有する蛋白分解活性がダニアレルギー疾患と密接に関係していると考えられている [Lancet, Jul., 15, 154 (1989)]。さらに、デルマトファゴイデス・ファリナエ (*Dermatophagoides farinae*) から単離されたプロテアーゼである Df-プロテアーゼは、炎症反応を増悪させ、かつ血管透過性を亢進させるブラジキニンの生成能力を有することが実験的に確かめられた [Biochem. Biophys. Acta, 1074, 62 (1991) ]。

【0003】 これらの事実を総合的に判断すると、イエダニのプロテアーゼがブラジキニンの生成を促進し、その結果、種々のダニアレルギー疾患が生じるものと推察される。従って、イエダニのプロテアーゼ活性を抑えることは、ダニアレルギー疾患（ダニに起因した喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎等）の治療および/または予防に有用であると考えられる。

【0004】

【従来の技術】 これまで、イエダニのプロテアーゼを阻害する物質はまったく報告されていない。一方、イエダニ以外のプロテアーゼ（例えば、トリプシン、プラスミン、トロンビン等）に対する阻害剤は多数知られているが、これらの阻害剤がイエダニのプロテアーゼを阻害することは知られていない。

【0005】

【発明の目的】 本発明者は、以上のような観点からイエダニプロテアーゼの阻害剤を見出すため鋭意検討を重ねた。本発明者は、ダニ以外のプロテアーゼ（例えば、トリプシン、プラスミン、キモトリプシン、カリクレイン

等)に対する阻害剤としては既知である種々の物質について、そのダニプロテアーゼに対する効果を調べたところ、意外にもすべての阻害剤が有効ではなく、ある特定の物質のみが阻害効果を有することを見出した。すなわち、従来、イエダニ以外のプロテアーゼ阻害剤として知られている物質の中でも、アプロチニン、ポテトプロテアーゼインヒビター、大豆トリプシンインヒビター、アンチパイン、ロイペプチン、グアニジノ脂肪酸誘導体およびグアニジノ安息香酸誘導体はダニプロテアーゼに対しても強力な阻害効果を示したが、アンチトリプシン、 $\alpha_2$ -マクログロブリンおよび $\epsilon$ -アミノカプロエートはほとんど阻害効果を示さなかった。さらに最近になって、アミジノフェノール誘導体も強力なダニプロテアーゼ阻害効果を有しているが、一方グアニジノフェノール誘導体のそれは弱いことが判明した。また、グアニジノ基またはアミジノ基を有する化学物質の中ではアミジノフェノール誘導体が最も強力なダニプロテアーゼ阻害効果を有していることも見出した。さらにダニプロテアーゼに対して阻害効果を有する物質は、インビボ (*in vivo*) の系のひとつであるダニプロテアーゼによる炎症反応(血管透過性の亢進)を実際に抑えることを始めて確認して本発明を完成した。

#### 【0006】

【発明の構成】本発明は、アプロチニン、ポテトプロテアーゼインヒビター、大豆トリプシンインヒビター、アンチパイン、ロイペプチン、グアニジノ脂肪酸誘導体、グアニジノ安息香酸誘導体、およびアミジノフェノール誘導体から選ばれる1種またはそれ以上の物質を有効成分として含有するダニアレルギー治療剤に関する。本発明で有効成分として用いられる各物質はいずれもよく知られているものばかりであるが、以下に詳細に説明する。

【0007】アプロチニンは、動物組織および血中に存在するポリペプチドであり、58個のアミノ酸よりなる分子量6511の物質であり [Biophys. Res. Commun., 18, 255(1965) 参照のこと]、カリクレイン、プラスミン、トリプシン、キモトリプシン等の蛋白分解酵素の阻害剤として知られている。本発明では、いずれの動物のいずれの組織または血中から得られたものをも用いることができる。

【0008】ポテトプロテアーゼインヒビターは、馬鈴薯中に存在する蛋白分解酵素阻害物質であり、細菌プロテアーゼ(納豆菌プロテアーゼ)作用を強力に阻害し、トリプシンの酵素作用をほとんど阻害しない分子量38,000のタイプI [兵庫農科大学研究報告, 6(1), 35 (1963)]と、トリプシン、キモトリプシン(牛血清)および細菌プロテアーゼ(納豆菌プロテアーゼ)作用を強力

に阻害する分子量20,000~25,000のタイプIIa、およびキモトリプシン(牛血清)および細菌プロテアーゼ(納豆菌プロテアーゼ)作用を強力に阻害し、トリプシンの酵素作用をほとんど阻害しない分子量20,000~25,000のタイプIIb [J. Biochem., 70, 817 (1971)]の3種類が知られており、いずれのインヒビターも本発明に用いることができる。

【0009】大豆トリプシンインヒビターは、大豆中に存在するポリペプチドであり、181個のアミノ酸よりなる分子量22,000のダイズクニツ( Kunitz) トリプシンインヒビター(以下、Kunitzと略記する。)と72個のアミノ酸よりなる分子量8,000のボウマンーピルク(Bowman-Birk) インヒビター(以下、BBIと略記する。)が知られており [代謝, 14(6), 1057 (1977)]、いずれも用いることができる。

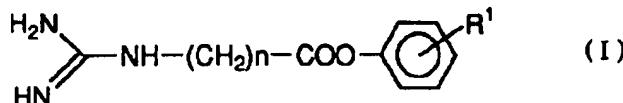
【0010】アンチパインは、エス・ミシガンensis (*S. michiganensis*)、エス・ヨコスカネンシス (*S. yokosukanensis*)、アクチノマイセス・バイオラセンス (*Actinomyces violascens*)などが産生する、構造式: Phe $\leftarrow$ C o $\rightarrow$ Arg $\rightarrow$ Val-Arginin a 1を有する物質であり、トリプシン、パパイン、プラスミン等の阻害物質として知られている。

【0011】ロイペプチンは種々のアクチノマイセス (*Actinomycetes*) が産生するオリゴペプチドで、基本構造式: R-Leu-Leu-Arg-CHO (RがアセチルであるものはロイペプチンAc-LL、RがプロピオニルであるものはロイペプチンPr-LLと呼ばれている。)を有する。さらにそれらの誘導体、例えば1個または2個のLeuがValやIleで置換されたものも知られている。本発明で用いられるロイペプチンにはこれらの誘導体も含まれる。ロイペプチンはトリプシン、プラスミン等の蛋白分解酵素の阻害剤として知られている。

【0012】グアニジノ脂肪酸誘導体としては、炭素数4~8の脂肪酸のω末端にグアニジノ基を有する化合物を基本構造とし、そのグアニジノ部分が種々の置換基で置換されているもの、および/またはその酸の誘導体、例えば種々のエステルやアミドが含まれる。また相当するチオエステルも含まれる。さらに、それらの非毒性の酸付加塩も含まれる。それらのグアニジノ脂肪酸誘導体の例としては、特公昭47-21977号、同50-2494号、同45-33175号、同49-2107号、特開昭48-29732号、同49-24917号、同51-75042号、同54-76532号に記載された化合物を挙げることができる。好ましくは、一般式(1)

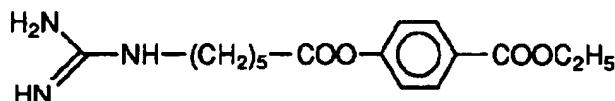
#### 【0013】

#### 【化1】



(式中、R<sup>1</sup> は水素原子、ハロゲン、ニトロ、アルキル、アルコキシ、カルボキシまたはアルコキシカルボニル基を表わし、n は3～6の整数を表わす。) で示される化合物またはその非毒性の酸付加塩が挙げられる。よ

り好ましい化合物として（化合物1）  
【0014】  
【化2】



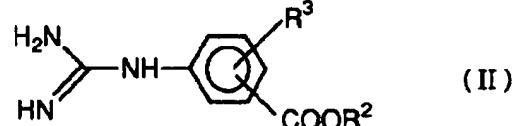
6-グアニジノヘキサン酸・p-エトキシカルボニルフェニルエステルおよびその非毒性の酸付加塩が挙げられる。

【0015】本発明に含まれる化合物の非毒性の酸付加塩としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩のごとき無機酸塩または酢酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、安息香酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、イセチオン酸塩、グルクロニ酸塩、グルコン酸塩のごとき有機酸塩が挙げられるが、好ましくはメタンスルホン酸塩である。グアニジノ安息香酸誘導体は、安息香酸のo-、m-またはp-位にグアニジノ基を有する化合物を基本構造とし、そのベンゼン環やグアニジノ部分が種々の置換基で置換されているもの、および/またはその酸の誘導体、例えばエステルやアミドが含まれる。また相当するチオエ斯特も含まれる。さらに、それらの非毒性の酸付加塩も含まれる。

【0016】本発明に含まれるグアニジノ安息香酸誘導体の例としては、特開昭48-29732号および同49-24917号（米国特許第3824267号）、同49-11842号、同50-4038号、同50-69035号、同51-16631号、同52-89640号（米国特許第4021472号）、同53-15412号、同53-147044号、同54-70241号および同55-55154号（米国特許第4224342

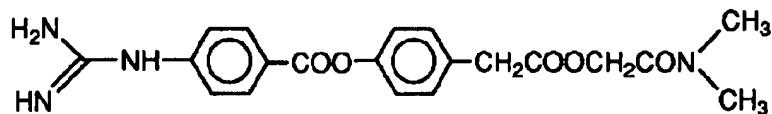
号）、同55-115865号および同55-115863号（米国特許第4283418号）、同56-34662号（米国特許第4310533号）、同62-111963号および同63-165357号（欧州特許公開第222608号）、同55-100356号、同56-110664号、同57-53454号、同57-142956号、同57-142957号、同57-179146号、同58-41855号、同58-49358号、同61-286361号、同61-286362号、同62-103058号、同62-155253号および英国特許公開第2083818号および第2095239号に記載された化合物を挙げることができる。好ましくは、一般式（II）

【0017】  
【化3】



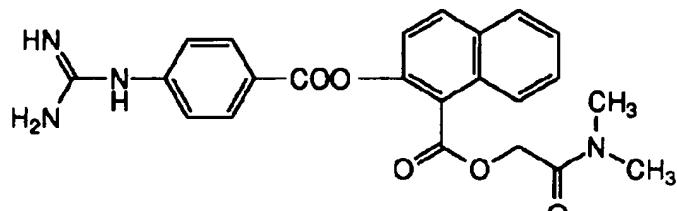
（式中、R<sup>2</sup> はフェニル基、ナチフル基、置換フェニル基または置換ナフチル基を表わし、R<sup>3</sup> は種々の置換基を表わす。）で示されるグアニジン安息香酸の誘導体またはその非毒性の酸付加塩が挙げられる。より好ましい化合物としては、

【0018】（化合物2）  
【化4】



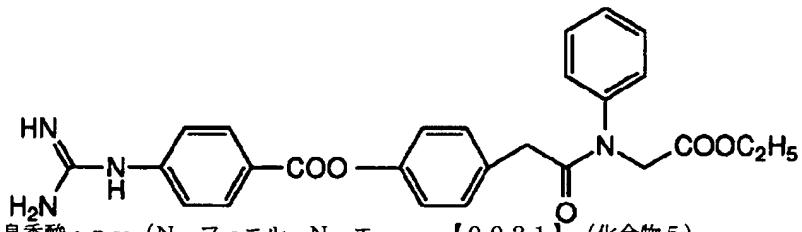
p-（p-グアニジノベンゾイルオキシ）フェニル酢酸・N、N-ジメチルカルバモイルメチルエステル

【0019】（化合物3）  
【化5】



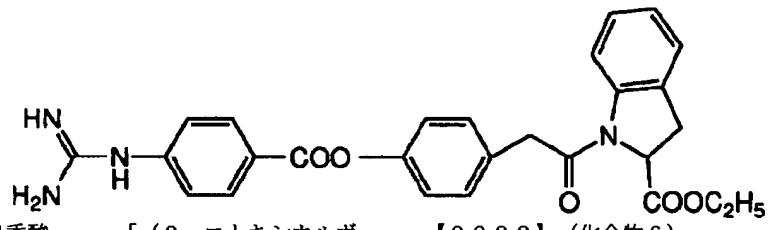
p-アミノグアニジノ安息香酸・1-(N,N-ジメチルカルバモイルメトキシカルボニル)-2-ナフチルエステル、

【0020】(化合物4)  
【化6】



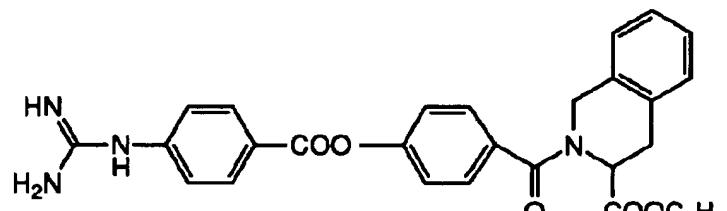
p-アミノグアニジノ安息香酸・p-(N-フェニル-N-エトキシカルボニルメチルカルバモイルメチル)フェニルエステル、

【0021】(化合物5)  
【化7】



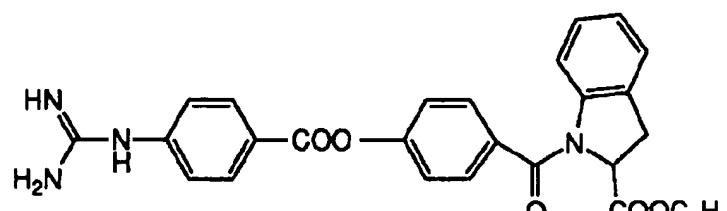
p-アミノグアニジノ安息香酸・p-[ (2-エトキシカルボニル-1-インドリニル)カルボニルメチル]フェニルエステル、

【0022】(化合物6)  
【化8】



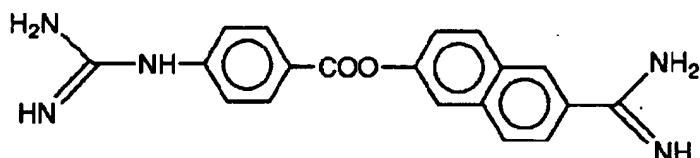
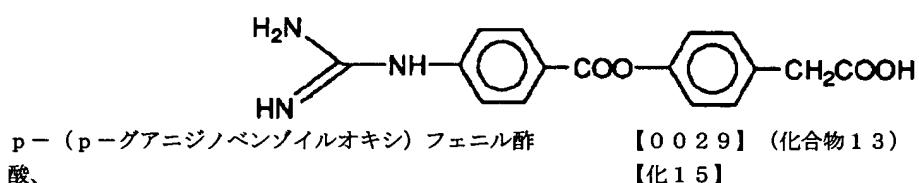
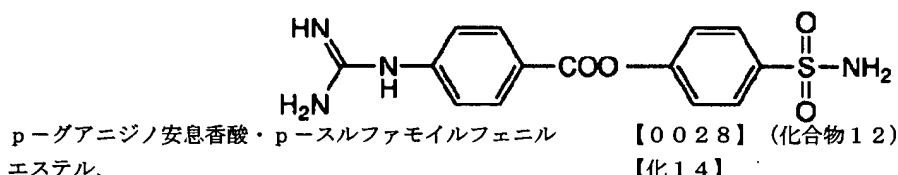
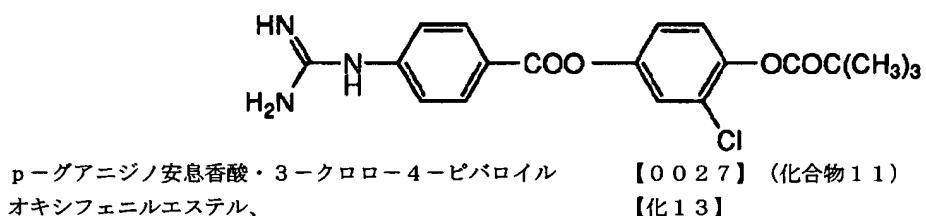
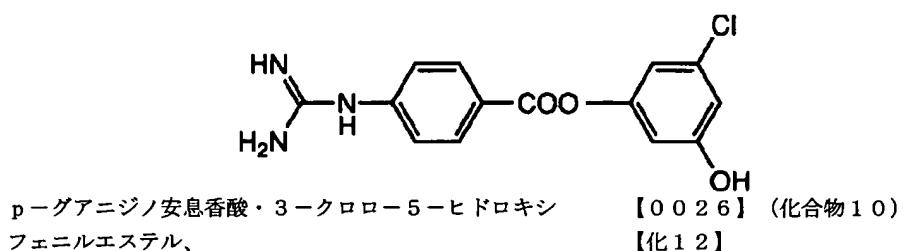
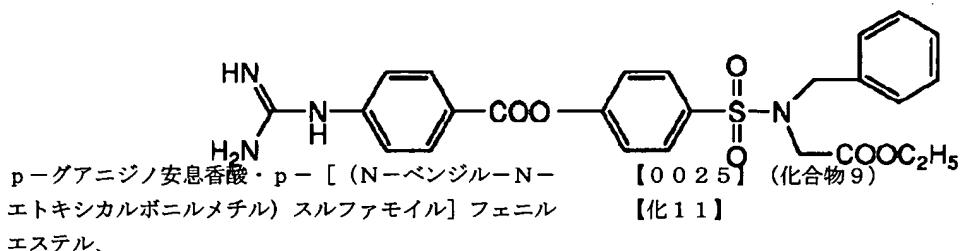
p-アミノグアニジノ安息香酸・p-[ (3-エトキシカルボニル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-2-イル)カルボニル]フェニルエステル、

【0023】(化合物7)  
【化9】



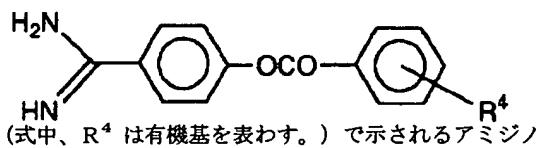
p-アミノグアニジノ安息香酸・p-[ (2-エトキシカルボニル-1-インドリニル)カルボニル]フェニルエステル、

【0024】(化合物8)  
【化10】

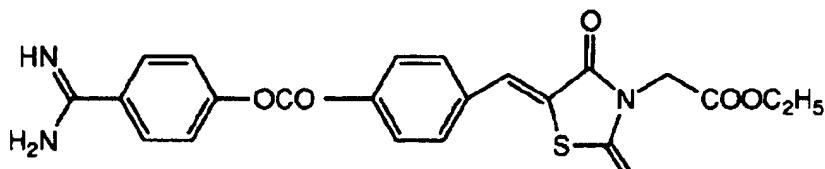


ある種のアミンとのアミドが含まれる。さらに、それらの非毒性の酸付加塩も含まれる。本発明に含まれるアミジノフェノール誘導体の例としては、特開昭58-41855号、特願平4-274992号および同5-96758号に記載された化合物を挙げることができる。好ましくは、一般式(I)

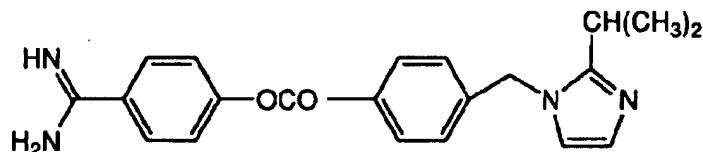
【0031】  
 【化16】



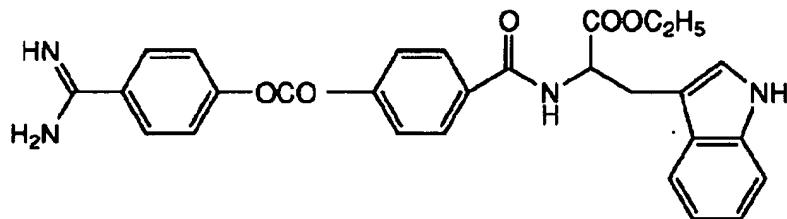
フェノール誘導体またはその非毒性の酸付加塩が挙げられる。より好ましい化合物としては、  
【0032】(化合物14)  
【化17】



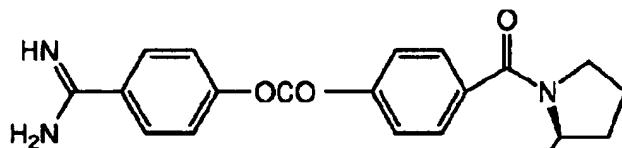
5-[p-(p-アミジノフェノキシカルボニル)ベンジリデン]-3-エトキシカルボニルメチルロダニン、  
【0033】(化合物15)  
【化18】



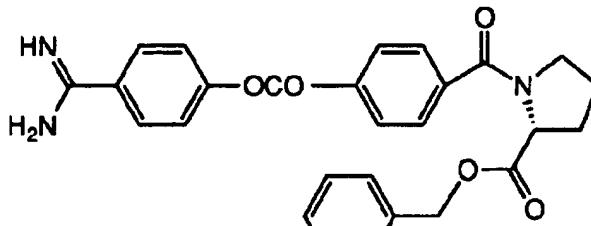
1-[p-(p-アミジノフェノキシカルボニル)ベンジル]-2-イソプロピルイミダゾール、  
【0034】(化合物16)  
【化19】



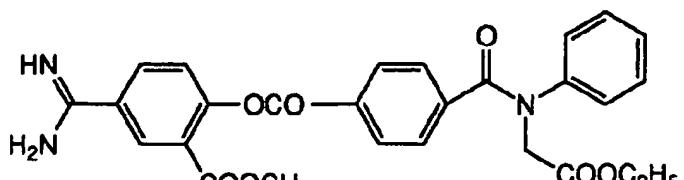
p-(p-アミジノフェノキシカルボニル)安息香酸・  
N-[1-エトキシカルボニル-2-(3-インドリル)エチル]アミド、  
【0035】(化合物17)  
【化20】



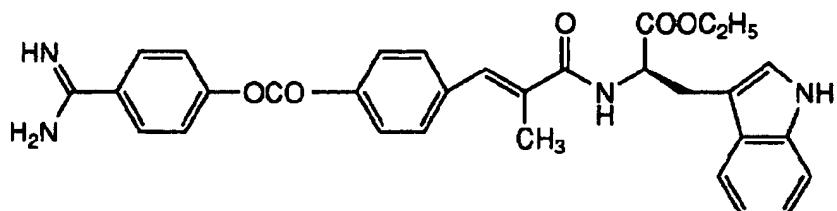
p-(p-アミジノフェノキシカルボニル)安息香酸・  
2S-エトキシカルボニル-1-ピロリジニルアミド、  
【0036】(化合物18)  
【化21】



p-(p-アミジノフェノキシカルボニル)安息香酸・  
2R-ベンジルオキシカルボニル-1-ピロリジニルアミド、  
【0037】(化合物19)  
【化22】



4-[4-(4-アミジノ-2-メトキシカルボニル)フェノキシカルボニル]安息香酸・N-フェニル-N-エトキシカルボニルメチルアミド、  
【0038】(化合物20)  
【化23】



p-(p-アミジノフェノキシカルボニル)-α-メチル桂皮酸・N-[1R-エトキシカルボニル-2-(3-インドリル)エチル]アミドおよびそれらの非毒性の酸付加塩が挙げられる。本発明では、個々の有効成分を単独で用いてもよいが、2種以上の有効成分を配合してひとつの製剤とすることもできる。

#### 【0039】

**【発明の効果】**本発明に用いられる各物質は、ダニプロテアーゼに対する強力な阻害活性、およびダニプロテアーゼに起因する炎症の抑制作用を有しており、かつ毒性が非常に少ないとから、ヒトを含めた哺乳動物、特にヒトに対するダニアレルギー疾患、例えば、ダニに起因した喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎等、の治療および/または予防に有用である。

【0040】本発明に用いられる各物質の毒性は非常に低いものであることが確認されている。例えば、アプロチニンのLD<sub>50</sub>値は2.5×10<sup>6</sup>カリクレインインヒター単位/kg(マウス、i.v投与)、ガベキサートメシレート(前記化合物1のメシリ酸塩)のLD<sub>50</sub>値は24.8mg/kg(マウス、i.v投与)、カモスタットメシレート(前記化合物Bのメシリ酸塩)のLD<sub>50</sub>値は21.0mg/kg(マウス、i.v投与)である。従って、本発明に用いられる物質はいずれも医薬として使用するために十分安全であり、適していると判断できる。

【0041】本発明で用いられる物質は、通常、全身的あるいは局所的に、経口または非経口で投与される。投与量は年令、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、通常成人ひとり当たり、1回につき1mg~1000mg、好ましくは50mg~500mgの範囲で、1日1回から数回経口投与されるかまたは成人ひとり当たり、1回につき0.1mg~100mgの範囲で、1日1回から数回静脈内投与されるか、または5~20%含有軟膏を1日1回から数回患部に塗布される。もちろん前記したように、投与量は種々の条件で変動するので、上記投

与量範囲より少ない量で十分な場合もあるし、また範囲を越えて必要な場合もある。

【0042】本発明による経口投与のための固体組成物としては、錠剤、散剤、顆粒剤等が含まれる。このような固体組成物においては、ひとつまたはそれ以上の活性物質が、少なくともひとつの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムと混合される。組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えばステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤や繊維素グリコール酸カルシウムのような崩壊剤、ラクトースのような安定化剤、グルタミン酸またはアスパラギン酸のような溶解補助剤を含有していてもよい。錠剤または丸剤は必要により白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートなどの胃溶性あるいは腸溶性物質のフィルムで被膜してもよいし、また2以上の層で被膜してもよい。さらにゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルとしてもよい。

【0043】経口投与のための液体組成物は、薬剤的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。この組成物は不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。経口投与のためのその他の組成物としては、ひとつまたはそれ以上の活性物質を含み、それ自体公知の方法により処方されるスプレー剤が含まれる。

【0044】本発明による非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水性の溶液剤、懸濁剤としては、例えば注射用蒸留水及び生理食塩水が含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤としては、例えばプロピレングリコ-

ル、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80等がある。このような組成物は、さらに防腐剤、保湿剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えば、ラクトース）、溶解補助剤（例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸）のような補助剤を含んでもよい。これらは例えばバクテリア保留フィルターを通すろ過、殺菌剤の配合または照射によって無菌化される。これらはまた無菌の固体組成物を製造し、使用前に無菌水または無菌の注射用溶媒に溶解して使用することもできる。本発明による非経口投与のための軟膏は常法により製造することができる。

#### 【0045】

【実施例】以下、実験例および実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実験例および実施例に限定されるものではない。

#### 【0046】実験例1：イエダニプロテアーゼに対する阻害効果

実験方法：イエダニプロテアーゼ（Df-プロテアーゼ）をイエダニ (*Dermatophagoidesfarinae*) の培養抽出物から、Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 91, 80(1990)記載の方法に従って精製した。精製された酵素 [150units/mg (37°C, pH 8)] はリン酸緩衝液

液 (PBS) (1mg/ml) 中、-80°Cで保存した。保存した酵素溶液は冷1mM塩酸で希釈してから使用した。該酵素の活性は、合成基質 (Boc-Gln-Gly-Arg-MCA) を用いて37°Cでカワバタらの方法 [Eur. J. Biochem., 172, 17 (1988)に記載] に従って蛍光的に決定した。種々の化合物 (0~0.2 μM) を含む50mMトリス-塩酸緩衝液 (pH8.0, 1880μl) に、ジメチルスルホキシドに溶解させた基質 (0~50 μM, 100 μl) を加えた。1mM塩酸に溶解させた酵素 (1.1nM, 20 μl) を加えた後、加水分解の初期値を、380nmで励起し、440nmで発光させて蛍光分光光度計で測定した。

【0047】各化合物のDf-プロテアーゼに対する阻害効果は、Df-プロテアーゼに対する各化合物のモル比を変えることによって評価した。すなわち、Df-プロテアーゼと各化合物の混合物を37°Cで1~3分間培養し（培養時間は各化合物によって変えた。）、残存酵素活性を先と同じ条件で測定した。Ki値を Lineweaver-Burkプロットより求めた。

【0048】結果：結果を表1に示す。

【0049】

【表1】

表1:D<sub>f</sub>-プロテアーゼに対する種々の化合物の阻害効果

化 合 物	阻害常数 (K <sub>i</sub> , M)
アプロチニン	$3.9 \times 10^{-10}$
ポテトプロテアーゼインヒビター I	$6.6 \times 10^{-10}$
ポテトプロテアーゼインヒビター II a	$9.2 \times 10^{-9}$
ポテトプロテアーゼインヒビター II b	$5.7 \times 10^{-9}$
大豆トリプシンインヒビター B B I	$8.0 \times 10^{-9}$
大豆トリプシンインヒビター Kunitz	$3.0 \times 10^{-9}$
アンチパイン	$4.1 \times 10^{-8}$
ロイペプチド(Ac-LL 1/2 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	$1.7 \times 10^{-8}$
化合物1のメタンスルホン酸塩	$2.5 \times 10^{-8}$
化合物2のメタンスルホン酸塩	$1.1 \times 10^{-7}$
化合物3の塩酸塩	$1.5 \times 10^{-8}$
化合物4の酢酸塩	$3.7 \times 10^{-8}$
化合物5の酢酸塩	$1.9 \times 10^{-8}$
化合物6の酢酸塩	$2.5 \times 10^{-8}$
化合物7の酢酸塩	$2.4 \times 10^{-8}$
化合物8の酢酸塩	$1.3 \times 10^{-8}$
化合物9の臭化水素酸塩	$6.8 \times 10^{-8}$
化合物10の酢酸塩	$3.3 \times 10^{-8}$
化合物11のメタンスルホン酸塩	$3.5 \times 10^{-8}$
化合物14の酢酸塩	$4.9 \times 10^{-8}$
化合物15の塩酸塩	$1.4 \times 10^{-8}$
化合物16の酢酸塩	$1.6 \times 10^{-8}$
化合物17の酢酸塩	$2.5 \times 10^{-8}$
化合物18の酢酸塩	$4.8 \times 10^{-9}$
化合物19の酢酸塩	$5.8 \times 10^{-9}$
化合物20の酢酸塩	$2.2 \times 10^{-8}$

[0050]

【表1】

表1 (つづき)

化 合 物	阻害常数 (K i, M)
アンチトリプシン	37 nMで阻害せず
$\alpha_2$ -マクログロブリン	280 nMで阻害せず
$\epsilon$ -アミノカプロエート	1 mMで阻害せず
4-[ (4-グアニジノ-2-カルボキシ) フェノキシカルボニル] 安息香酸・N-フェニル-N-エトキシカルボニルメチルアミド	阻害せず
p-(p-グアニジノフェノキシカルボニル) 安息香酸・2S-エトキシカルボニル-1-ピロリジニルアミド	$1.5 \times 10^{-6}$

【0051】すべての蛋白分解酵素阻害剤がDf-プロテアーゼに対して阻害作用を有している訳ではなく、特定の物質のみが阻害効果を示していることが表1より理解される。

【0052】実験例2:Df-プロテアーゼによる血管透過性亢進に対する抑制効果

実験方法：実験は、モルモット(350～400g)を用いて行なった。すなわち、生理食塩水に溶解したエバנסブルーの1%溶液を20mg/kg動物体重の割合で静脈内投与した後すぐにDf-プロテアーゼ(0.01～0.8nmol)を含むPBS溶液(100μl)またはDf-プロテアーゼ(0.4nmol)とアプロチニン(0.1～0.6nmol)の混合溶液を皮内投与した。投与30分後、投与部位の皮膚表面に透過したエバансブルーのスポットの大きさによって、血管透過性を評価した。

【0053】結果：結果を図1に示す。図中、レーンAは左よりDf-プロテアーゼを0.01、0.03、0.09、0.27および0.80nmol含むPBS溶液を投与した時の血管透過性を示す。Df-プロテアーゼの濃度に依存して血管透過性が亢進していることがわかる。レーンBはDf-プロテアーゼ(0.4nmol)とアプロチニン(左より0.1、0.2、0.3、0.4および0.6nmol)の混合溶液を投与した時の血管透過性を示す。アプロチニンの濃度に依存して、Df-プロテアーゼによる血管透過性の亢進作用が

抑制されていることがわかる。血管透過性の亢進は炎症の一現象であり、Df-プロテアーゼによってダニアレルギーの病態のひとつが現われたことを示している。従って、本実験では、本発明に用いられる物質のひとつであるアプロチニンの投与によりダニアレルギー症状が抑えられることがインビボで確認されたことになる。

【0054】製剤実施例1

アプロチニン10mgを生理食塩水500mlに十分溶解させ、得られた溶液を常法により殺菌消毒し、5mlずつアンプルに充填後、凍結乾燥することにより、1アンプル中に100μgの活性成分を含有する注射剤1000本が得られた。

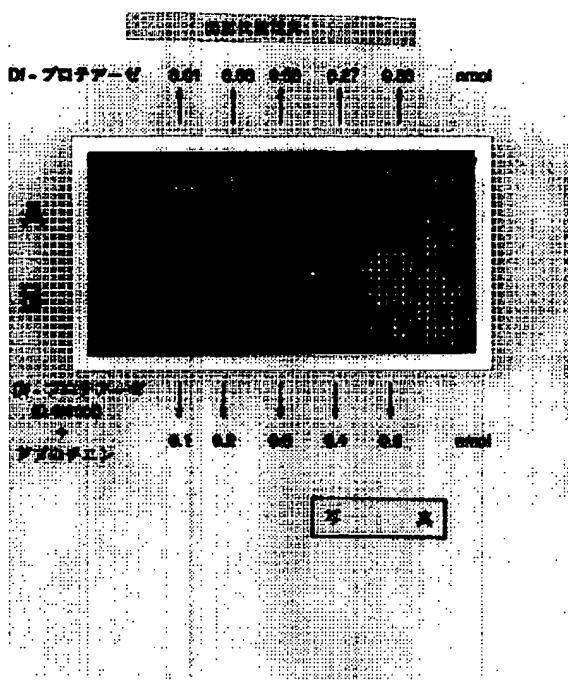
【0055】製剤実施例2

カモスタッフメシレート100g、ステアリン酸マグネシウム2g、および乳糖18gを均一になるまでよく混合した後、常法により打錠して、1錠中に100mgの活性物質を含む錠剤1000錠を得た。得られた錠剤は常法によりヒドロキシプロピルセルロースでコーティングし、目的とする経口投与錠剤とした。

【図面の簡単な説明】

【図1】モルモットを用いたDf-プロテアーゼによる血管透過性亢進に対する効果をみた時の生物の形態を表わす写真である。

【図 1】



---

フロントページの続き

(72)発明者 小寺 洋  
東京都杉並区和泉4-49-5 カーサ和泉  
204